DOI:10.12441/spyswjs.20240408002 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0087-10

酱香型白酒窖泥中乳酸菌的分离鉴定及全基因组测序分析

黄河鸥[1,2,3] 吴 成[1,2,3] 杨少娟[1,2,3] 谢 丹[1,2,3] 赵雯宇[1,2,3] 杨军林[1,2,3] 胡建锋[1,2,3]
胡 峰[1,2,3] 汪地强[1,2,3*]

(1. 贵州习酒股份有限公司,贵州 遵义,564622; 2. 贵州省白酒制造业创新中心,贵州 遵义,563000; 3. 中国轻工业酱香型白酒智能酿造工程技术研究中心,贵州 遵义,564622)

摘要:【目的】开发酱香型白酒窖泥中功能微生物菌种资源,探索其优化发酵过程和提升白酒品质的潜力。**【方法】**采用平板稀释涂布法从酱香型白酒窖泥中筛选乳酸菌,并进行形态学和分子生物学鉴定;采用高效液相色谱、气相色谱检测菌株的代谢产物,并运用Illumina测序技术对菌株进行全基因组测序。**【结果】**从酱香型白酒窖泥中分离筛选得到11株乳酸菌,其中植物乳植杆菌(*Lactobacillus plantarum*)r-JN-1的生长速率较快且产酸能力最强。植物乳植杆菌r-JN-1的pH、温度、NaCl溶液耐受范围分别为4.0~10.0、25~40 ℃、0~7 g/dL,且可利用多种糖类进行发酵。植物乳植杆菌r-JN-1培养液中挥发性成分测定结果表明,其能够发酵产生醋嗡、乳酸乙酯等多种酱香型白酒中的重要香气成分。植物乳植杆菌r-JN-1全基因组测序分析结果表明,其基因组序列大小为3 330 678 bp,GC占比44.32%,蛋白质编码基因3 301个。分别在COG、GO、KEGG、CAZy数据库中进行基因注释,均得到大量碳水化合物代谢相关基因。**【结论】**该研究为乳酸菌的拓展应用以及白酒酿造功能微生物的进一步挖掘提供了理论依据。

关键词:乳酸菌;分离鉴定;全基因组;窖泥;酱香型白酒

Isolation, Identification, and Whole Genome Sequencing of Lactic Acid Bacteria from Pit Mud of Jiangxiangxing Baijiu

HUANG Heou[1,2,3] *WU Cheng*[1,2,3] *YANG Shaojuan*[1,2,3] *XIE Dan*[1,2,3] *ZHAO Wenyu*[1,2,3]
YANG Junlin[1,2,3] *HU Jianfeng*[1,2,3] *HU Feng*[1,2,3] *WANG Diqiang*[1,2,3*]

(1. Guizhou Xijiu Co., Ltd., Zunyi 564622, China; 2. Guizhou Province Manufacturing Innovation Center for Baijiu, Zunyi 563000, China; 3. Engineering Technology Research Center of Jiang-flavor Baijiu Intelligent Brewing, China National Light Industry Council, Zunyi 564622, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to develop functional microbial strain resources from the pit mud of Jiangxiangxing Baijiu and explore their potential in optimizing the fermentation process and improving Baijiu quality. [**Method**] Lactic acid bacteria were screened from the pit mud of Jiangxiangxing Baijiu by the spread plate method and then identified by morphological and molecular biological methods. The metabolites of the strains were detected by high performance liquid chromatography and gas chromatography, and the whole genomes of the strains were sequenced *via* the Illumina sequencing technology. [**Result**] Eleven strains of lactic acid bacteria were isolated and screened from the pit mud of Jiangxiangxing Baijiu. Among them, *Lactobacillus plantarum* r-JN-1 had the faster growth and the strongest acid production capacity. *Lactobacillus plantarum*

基金项目:2023年度贵州省科技支撑计划项目(一般项目342,一般项目343)。
通信作者:汪地强(1976—),男,博士,工程技术应用研究员,主要从事白酒酿造与白酒风味研究。E-mail:diqiangwang@163.com
收稿日期:2024-04-08 **修回日期:**2024-05-10

r-JN-1 tolerated pH 4.0~10.0, temperatures of 25~40 ℃, and NaCl solutions with the concentrations of 0~7 g/dL. Meanwhile, it could use a variety of sugars for fermentation. The determination of volatile components in the culture liquid of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1 showed that fermentation with this strain could produce various key aroma components of Jiangxiangxing Baijiu, such as 3-hydroxy-2-butanone and ethyl lactate. The whole genome sequencing results showed that the genome sequence of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1 was 3 330 678 bp, with the GC content of 44.32% and 3 301 protein-encoding genes. The gene annotation results in COG, GO, KEGG, and CAZy databases showed that *Lactobacillus plantarum* r-JN-1 carried extensive genes associated with the metabolism of carbohydrates. [**Conclusion**] This study provided a theoretical basis for further exploring functional microorganisms in the brewing of Baijiu and expanding the application of lactic acid bacteria.

Keywords: lactic acid bacteria; isolation and identification; whole genome; pit mud; Jiangxiangxing Baijiu

酱香型白酒的传统生产工艺中，通常采用泥底条石窖作为发酵设备[1]，并采用窖泥来泥封塑料膜的双层密封模式进行封窖[2]，不同封窖方式会对窖底酒及窖面酒2种调味酒的品质产生直接影响[3]。窖泥既满足了窖池厌氧发酵过程的密封性要求，又富含大量微生物，且可以作为微生物生长的载体，在酱香型白酒的生产过程中具有重要作用。我国在20世纪60年代才开展窖泥微生物相关研究[4]。乳酸菌是窖泥的主要细菌类别之一，既是浓香型白酒发酵结束时的优势微生物[5]，也是酱香型白酒酿造过程重要的功能菌群，且乳酸菌具有促进发酵、推动美拉德反应和维持酒体微生态平衡等作用[6]。乳酸菌能产生多种对酒体风味有重要作用的代谢产物，其中乳酸能够使酒体协调柔和、掩盖乙醇刺激性；乙酸则具有爽口微甜的特征[7-8]。Liu等[9]研究表明，乳酸菌可与酿酒酵母共同作用，调控白酒生产过程，适量的乳酸菌对白酒风味起到较好的作用，影响白酒的香型和风格。

近年来，高通量测序技术被广泛应用于研究酿造微生物的多样性[10]，已有相关研究报道了不同窖龄[11-12]、产区[13-14]、空间位置[15]和质量等级[16]的白酒窖泥的微生物群落结构组成。Li等[17]解析了白酒窖泥发酵初期与后期的微生物多样性和分布，发现乳酸菌是高产窖泥的优势菌属和生物标志物，也是唯一组成关联网络的菌属。沈毅等[18]对郎酒大曲、酒醅和窖泥的细菌差异进行了比较，发现乳酸杆菌属在窖泥细菌菌群中的丰富度最高，是主要的优势细菌属。然而，目前对窖泥乳酸菌的研究主要集中在浓香型白酒，针对酱香型白酒生产过程中使用窖泥的相关研究较少。因此，对酱香型白酒窖泥中的乳酸菌组成及其功能进行研究，有助于白酒酿造功能微生物菌种资源的开发及应用。

该研究采用平板稀释涂布法对酱香型白酒窖泥中的乳酸菌进行分离鉴定，并基于菌株生长速率和产酸能力等对其功能性进行评价。进一步分析其全基因组测序结果，利用生物信息学方法挖掘基因组组分并进行功能解析，旨在了解窖泥中乳酸菌的存在属性和代谢特性，探索在酱香型白酒酿造中通过调节乳酸菌来优化发酵和提升白酒品质的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

窖泥由贵州省某知名酱酒企业提供。从不同车间窖池的窖泥不同位置随机取样，混匀包装，于4 ℃冰箱保藏备用。

DNA提取试剂盒：生工生物工程（上海）股份有限公司；挥发性化合物（叔戊醇、乙酸正戊酯、2-乙基丁酸）标准品：美国Sigma公司；Hieff NGS® MaxUp II DNA Library Prep Kit for Illumina®：翌圣生物科技（上海）股份有限公司；Qubit™ dsDNA HS Assay Kit：美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 培养基

所用培养基为MRS培养基、MRS-$CaCO_3$培养基、PY基础培养基及PYG琼脂培养基。

1.3 仪器与设备

PCR仪：C1000 Touch型，美国BIO-RAD公司；高效液相色谱仪：1260 Infinity型，美国Agilent Technologies公司；气相色谱仪：8890型，美国Agilent Technologies公司；全自动生长曲线测定仪：BIOSCREEN C PRO型，芬兰Bioscreen公司；立式蒸汽灭菌器：CL-32L型，日本Kagoshima Seisakusyo公司。

1.4 方法

1.4.1 乳酸菌的分离鉴定

称取10 g窖泥样品于90 mL无菌水中，于25 ℃、180 r/min振荡30 min，吸取1 mL悬浮液进行梯度稀释，利用MRS-$CaCO_3$培养基通过平板稀释涂布法和倾倒法分离乳酸菌，观察菌落在培养基上的形态。利用DNA基因组抽提试剂盒提取DNA，使用细菌通用引物27F及1492R进行PCR扩增，反应体系为：模板DNA 1.0 μL、6×PCR缓冲液2.0 μL、dNTP Mix 1.0 μL、正向引物1.0 μL、反向引物1.0 μL、聚合酶*Taq* DNA Polymerase 0.5 μL，并补充ddH_2O 13.5 μL。PCR扩增程序为：95 ℃预变性5 min；94 ℃变性45 s，58 ℃退火45 s，72 ℃延伸2 min，进行35个循环；72 ℃延伸10 min；降温至4 ℃，取出产物。产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，测序结果提交至NCBI进行Blast+比对分析。通过MEGA 7.0软件的选择邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统发育树。

1.4.2 乳酸菌生长速率的测定

菌悬液按体积分数2%接种至MRS液体培养基中，37 ℃培养12 h后得到种子液。向孔板中加入300 μL MRS液体培养基和50 μL种子液并混匀，置于37 ℃生长曲线测定仪中，每30 min测定OD_{600}值，得到乳酸菌的生长速率。

1.4.3 乳酸菌产酸能力的测定

种子液按体积分数2%接种于MRS培养基，于37 ℃、100 r/min培养24 h，参照孙优兰等[19]的方法测定菌液中乳酸、乙酸的质量浓度。

1.4.4 乳酸菌的功能性评价

1）形态学观察鉴定：菌株接种于MRS固体培养基，37 ℃培养48 h，挑取单菌落进行革兰氏染色并进行显微镜观察。另将菌株连带培养基一起挑下置于电镜固定液内，室温固定2 h，转移至4 ℃保存，制片后于扫描电子显微镜下观察其菌丝体及孢子结构特征。

2）耐受性试验：利用乳酸将MRS液体培养基pH调节为2.0~10.0，以pH 1.0为梯度差，乳酸菌种子液按体积分数2%进行接种，37 ℃培养48 h，观察菌株生长情况。将乳酸菌划线于MRS培养基后分别置于20~60 ℃的培养箱中培养48 h，观察菌株生长情况。MRS液体培养基中分别加入NaCl至质量浓度为0~8 g/dL，以NaCl质量浓度1.0 g/dL为梯度差，按体积分数2%接种乳酸菌，37 ℃培养48 h，观察乳酸菌生长情况。

3）糖发酵试验：在PY基础培养基内分别加入30 g/L的蔗糖、聚葡萄糖等13种糖类物质，灭菌后接种乳酸菌并于37 ℃培养48 h，观察乳酸菌生长情况。

4）挥发性代谢产物的测定：种子液按体积分数2%接种于MRS培养基，于37 ℃、100 r/min培养24 h，参照孙优兰等[19]的方法，用气相色谱-氢火焰检测器（GC-FID）测定菌液及空白培养基中的挥发性代谢产物。

5）乳酸菌的全基因组测定及功能基因预测：乳酸菌的全基因组测序由生工生物工程（上海）股份有限公司完成，基于Illumina HiSeq平台进行测序，使用FastQC对样本的测序数据质量进行可视化评估，用Trimmomatic进行数据处理，用SPAdes进行拼装。使用Prokka预测基因元件，采用RepeatMasker鉴定基因组上的重复序列。分别经过NCBI Blast+、Swissprot及TrEMBL、KAAS、HMMER3对比分析得到COG、GO、KEGG、CAZy数据库的功能注释信息，利用TMHMM进行跨膜蛋白预测分析。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离鉴定

采用MRS-$CaCO_3$培养基，利用平板稀释涂布法从酱香型白酒窖泥中共分离得到11株有较明显溶钙圈且革兰氏染色结果为阳性的菌株，分别命名为r-JN-1~r-JN-11。进一步对分离菌株进行16S rDNA测序，并采用NCBI Blast+比对分析，结果表明分离得到的菌株归属于乳酸菌2个属的5个种，序列相似度均>98%。其中r-JN-1、r-JN-5、r-JN-6为植物乳植杆菌，r-JN-2为戊糖乳杆菌（*Lactiplantibacillus pentosus*），r-JN-3、r-JN-7、r-JN-10、r-JN-11为棒状乳杆菌（*Loigolactobacillus coryniformis*），r-JN-4为短促生乳杆菌（*Levilactobacillus brevis*），r-JN-8、r-JN-9为台湾乳球菌（*Lactococcus taiwanensis*），将所得菌株的16S rDNA序列与模式菌株序列进行比对并绘制系统发育树，结果见图1。相关研究表明，乳杆菌属在酱香型白酒发酵过程中是优势细菌属，且该菌属与各轮次基酒中的风味物质的相关性较强，分别与14个风味物质具有相关性[20]，可以产生乳酸和酯类化合物，促进白酒挥发性化合物的生成[21]，同时乳杆菌在酸茶、黄酒等发酵产品的风味形成中发挥重要作用。

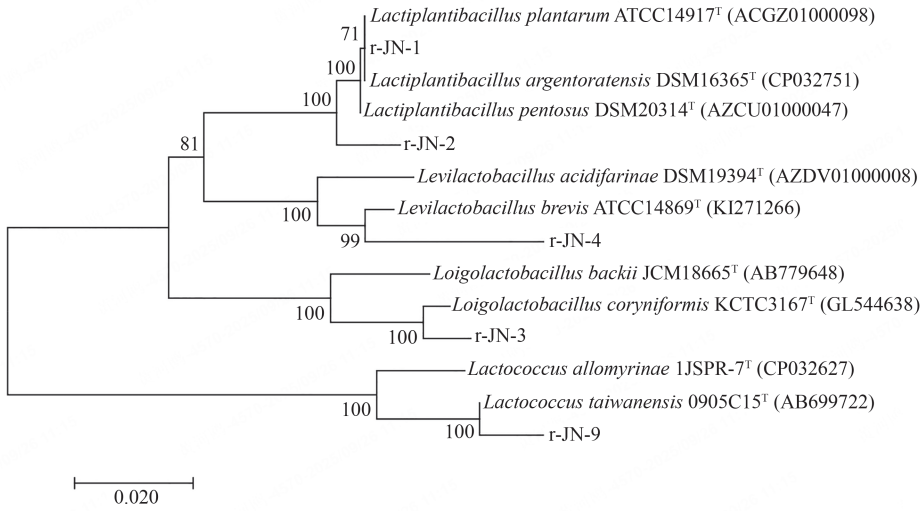


图 1　酱香型白酒窖泥中乳酸菌的系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree of lactic acid bacteria in pit mud of Jiangxiangxing Baijiu

2.2　生长速率及产酸能力分析

测定上述筛选得到的 11 株乳酸菌的生长速率及产酸能力。由图 2(a)可知，植物乳植杆菌整体生长速率较快，其中植物乳植杆菌 r-JN-1 的生长速率最快，在培养 1.5 h 后进入对数生长期，约 9 h 达到稳定期。台湾乳球菌整体生长速率较慢，迟缓期长且对数生长期短。由图 2(b)可知，植物乳植杆菌 r-JN-1 产生的乳酸、乙酸的质量浓度均最高，分别为 26.74、1.18 g/L。王梦创[22]研究表明，植物乳植杆菌是一种产乳酸能力强且在酱酒酿造过程中相对丰度较高的乳酸菌。

2.3　植物乳植杆菌 r-JN-1 的功能性评价

2.3.1　菌落形态及显微特征

菌落形态及镜检结果如图 3 所示，植物乳植杆菌 r-JN-1 呈乳白色、不透明状，边缘整齐且中心凸起；光学显微镜镜检结果显示，其菌体为圆端、直或弯的杆状，革兰氏染色结果呈阳性；扫描电镜结果显示，其菌体呈短杆状，长 15.0~45.0 μm，宽 1.5~2.5 μm。

2.3.2　耐受性测定结果

酱香型白酒发酵时的温度较高，且酸度随着发酵的进程不断升高，因此要求乳酸菌具有良好的耐高温、耐酸特性。利用乳酸菌进行发酵的食品如泡菜、腐乳等渗透压均较高，要求乳酸菌具有较好的高渗透压环境适应能力。因此，分别测定植物乳植杆菌 r-JN-1 的 pH、温度、NaCl 耐受性，结果如表 1 所示。植物乳植杆菌 r-JN-1 在 pH 2.0 条件下的生长受到抑制，在 pH 3.0 的条件下可以微弱生长，在 pH 为 4.0~10.0 时均能够良好生长，pH 4.0 时生长状态最佳，表明其具有良好的耐酸碱特性。当培养温度为 25~40 ℃时，植物乳植杆菌 r-JN-1 生长状况良好，

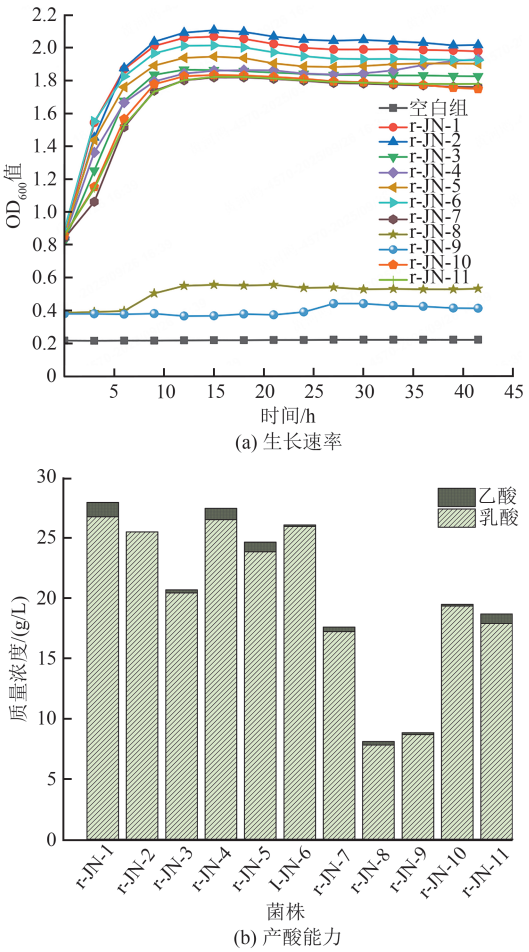
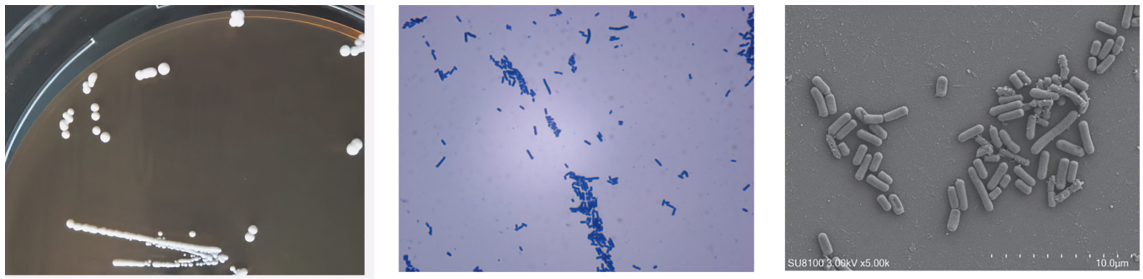


图 2　不同乳酸菌生长速率及产酸能力比较

Fig. 2　Comparison of growth rates and acid production capacity of different strains of lactic acid bacteria



(a) 菌落形态　(b) 光学显微镜镜检结果　(c) 扫描电子显微镜下的细胞形态图

图 3　植物乳植杆菌 r-JN-1 的菌落形态、光学显微镜镜检结果及扫描电子显微镜下的细胞形态

Fig. 3　Colony morphology, microscopic results, and cell morphology under scanning electron microscope of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1

随着温度(≥45 ℃)继续升高其生长受到抑制。菌株生长能力随着 NaCl 质量浓度的增大而下降，当 NaCl 质量浓度为 7 g/dL 时，植物乳植杆菌 r-JN-1 能够微弱生长，此时仍具有一定的耐受性，与钟源等[23]的研究结论一致。此外，有研究表明乳酸菌的酸应激主要包括氢离子腺苷三磷酸酶(F_0F_1-ATP 酶)、谷氨酸脱羧酶、精氨酸脱亚胺酶等途径[24]，这些途径可有效增加乳酸菌对酸性环境的抗性。

表 1　植物乳植杆菌 r-JN-1 耐受性试验结果

Table 1　Tolerance test results of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1

测定项目		菌株生长情况	测定项目		菌株生长情况	测定项目		菌株生长情况
pH	2.0	−	温度/℃	20	−	NaCl 质量浓度/(g/dL)	0	+
	3.0	w		25	+		1	+
	4.0	++		28	+		2	+
	5.0	+		37	++		3	+
	6.0	+		40	+		4	+
	7.0	+		45	w		5	+
	8.0	+		50	−		6	+
	9.0	+		55	−		7	w
	10.0	+		60	−		8	−

注：“++”代表菌株生长旺盛；“+”代表菌株生长良好；“w”代表菌株生长微弱；“−”代表菌株不生长。

2.3.3　糖发酵试验结果

菌株在发酵过程中利用碳水化合物种类的范围和利用能力的强弱，会直接影响其在不同碳水化合物环境中的生长能力。探究植物乳植杆菌 r-JN-1 对单糖(葡萄糖)、二糖(乳糖、蔗糖)、多糖(聚葡萄糖)等 13 种碳水化合物的利用能力，结果见表 2。除水溶性壳聚糖外，其余糖类均可被植物乳植杆菌 r-JN-1 利用；其中该菌株在海藻糖和 *β*-葡聚糖中的生长情况最优，且产酸能力强。*L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖是乳酸菌较难利用的碳水化合物，郑彦坤[25]研究了 6 株植物乳植杆菌的碳水化合物利用能力，发现均不能利用 *L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖，而本研究中分离到的植物乳植杆菌 r-JN-1 可以对 *L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖进行分解利用。

表 2　植物乳植杆菌 r-JN-1 糖发酵试验结果

Table 2　Sugar fermentation test results of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1

糖类	菌株生长情况	糖类	菌株生长情况
蔗糖	+	*L*-阿拉伯糖	w
聚葡萄糖	+	海藻糖	++
甘露寡糖	+	乳糖	+
D-果糖	+	*L*-鼠李糖	+
β-葡聚糖	++	低聚木糖	+
代聚半乳糖	+	葡萄糖	+
水溶性壳聚糖	−		

注：“++”代表菌株生长旺盛；“+”代表菌株生长良好；“w”代表菌株生长微弱；“−”代表菌株不生长。

2.3.4　挥发性代谢产物的测定结果

如图 4 所示，排除培养基影响，在植物乳植杆菌 r-JN-1 培养液中共测定到 20 种代谢产物，包括 9 种酯类、3 种醇类、3 种酸类、3 种醛类、2 种酮类。植物乳植杆菌 r-JN-1 除能产生乳酸乙酯、甲酸乙酯、乙酸乙酯、油酸乙酯等在酱香型白酒风味中有重要贡献的酯类，丰富白酒香气外，其所生成的醋嗡质量浓度也较高，达 99.06 mg/L。醋嗡是形成酱香型白酒特征风味成分四甲基吡嗪的重要前体物质，其与氨发生非酶促反应生成的四甲基吡嗪既是酱香型白酒中的重要风味物质，又是一种健康功能因子。目前，文献报道的醋嗡产生菌多为芽孢杆菌，少部分为乳酸乳球菌和酵母菌[26]；但酱香型白酒产酒的主要时期是窖池发酵阶段，而芽孢杆菌多

为好氧菌，进入窖池发酵后为厌氧状态，不适宜芽孢杆菌生长代谢，因此其应用受到限制[27]。植物乳植杆菌可在厌氧环境下良好生长且具有耐酸特点，因此，植物乳植杆菌 r-JN-1 具有促进酱香型白酒风味形成和发挥健康功能的潜力。

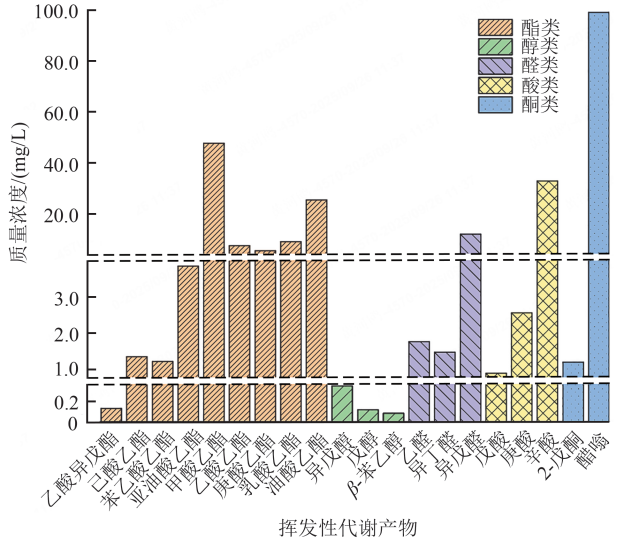


图 4　植物乳植杆菌 r-JN-1 挥发性代谢产物的测定结果

Fig. 4　Determination results of volatile metabolites from *Lactobacillus plantarum* r-JN-1

2.4　植物乳植杆菌 r-JN-1 的全基因组测序及功能基因预测结果

2.4.1　全基因组测序结果

全基因组测序结果表明，植物乳植杆菌 r-JN-1 的基因组大小为 3 330 678 bp，GC 占比 44.32%；编码基因总长度为 2 794 456 bp，有 3 301 个蛋白质编码基因，平均长度为 847 bp，同时预测到 65 个 tRNA、6 个 rRNA。利用 KEGG、COG、GO 等数据库对基因功能进行预测，共预测得到功能基因 3 156 个，与植物乳植杆菌模式菌株 WCFS1 的测序结果相似[28]。植物乳植杆菌 r-JN-1 的全基因组图谱见图 5，将其全基因组序列提交至 NCBI，获得登录号为：JAWJEM000000000。

2.4.2　植物乳植杆菌 r-JN-1 的基因组注释结果

1）COG 数据库注释结果：为推测基因序列功能，在 COG 数据库中进行注释。由图 6 可知，植物乳植杆菌 r-JN-1 在 COG 数据库中，共有 2 291 个基因分布于 20 个条目中被注释，主要集中在一般功能预测、碳水化合物运输与代谢、转录、氨基酸运输与代谢等，其中与碳水化合物运输与代谢相关的基因有 267 个（11.65%）。基因组中存在多种编码、运输糖代谢的基因及相应的调控蛋白质，预示其具有较强的碳水化合物利用能力，可以代谢多种糖类物质，所以对环境的适应性更强[29]。酱香型白酒采用开放式生产方式，生产环境复杂，植物乳植杆菌 r-JN-1 的强碳水化合物利用能力可以有效应对复杂环境，进一步的代谢反应对酱香型白酒的风味有重要作用。

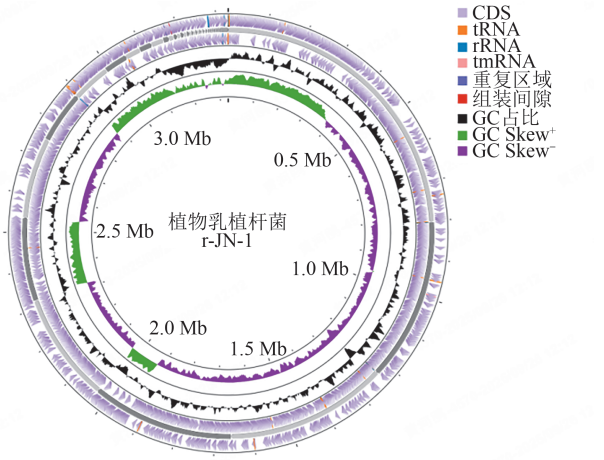
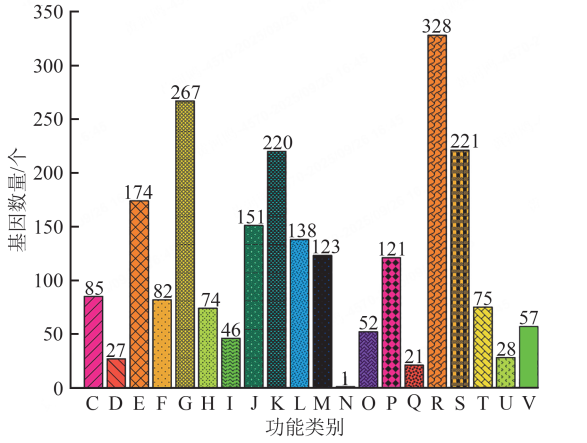


图 5　植物乳植杆菌 r-JN-1 的基因组圈图

Fig. 5　Genome circle diagram of *Lactobacillus plantarum* r-JN-1



C—能源生产与转换；D—细胞周期调控、细胞分裂、染色体分区；E—氨基酸运输与代谢；F—核苷酸转移与代谢；G—碳水化合物运输与代谢；H—辅酶运输与代谢；I—脂质运输与代谢；J—翻译、核糖体结构与生物合成；K—转录；L—复制、重组与修复；M—细胞壁/细胞膜/细胞背膜的生物合成；N—细胞运动性；O—翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣；P—无机离子运输与代谢；Q—次级代谢产物生物合成、运输与代谢分解；R—一般功能预测；S—功能未知；T—信号传导机制；U—胞内运输、分泌与膜泡运输；V—防御机制。

图 6　COG 数据库的基因功能注释结果

Fig. 6　Gene function annotation results in the COG database

2）GO 数据库注释结果：为支撑该菌株进化和功能研究，将序列在 GO 数据库中进行比对，共有 2 177

个基因得到注释，见图7。结果表明，在植物乳植杆菌r-JN-1基因组中，参与生物过程的基因主要是参与代谢过程（1 364个基因）和细胞过程（1 342个基因）；在分子功能中，主要是催化活性（1 403个基因）和结合活性（1 223个基因），表明植物乳植杆菌r-JN-1具有较强的催化活性和代谢能力。植物乳植杆菌中含有*β*-葡萄糖苷酶基因[30]，*β*-葡萄糖苷酶是纤维素降解过程中的关键限速酶，可催化酿酒原料中不易分解的纤维素水解，这一过程能为其他微生物的代谢提供物质基础，可提高原料利用率。

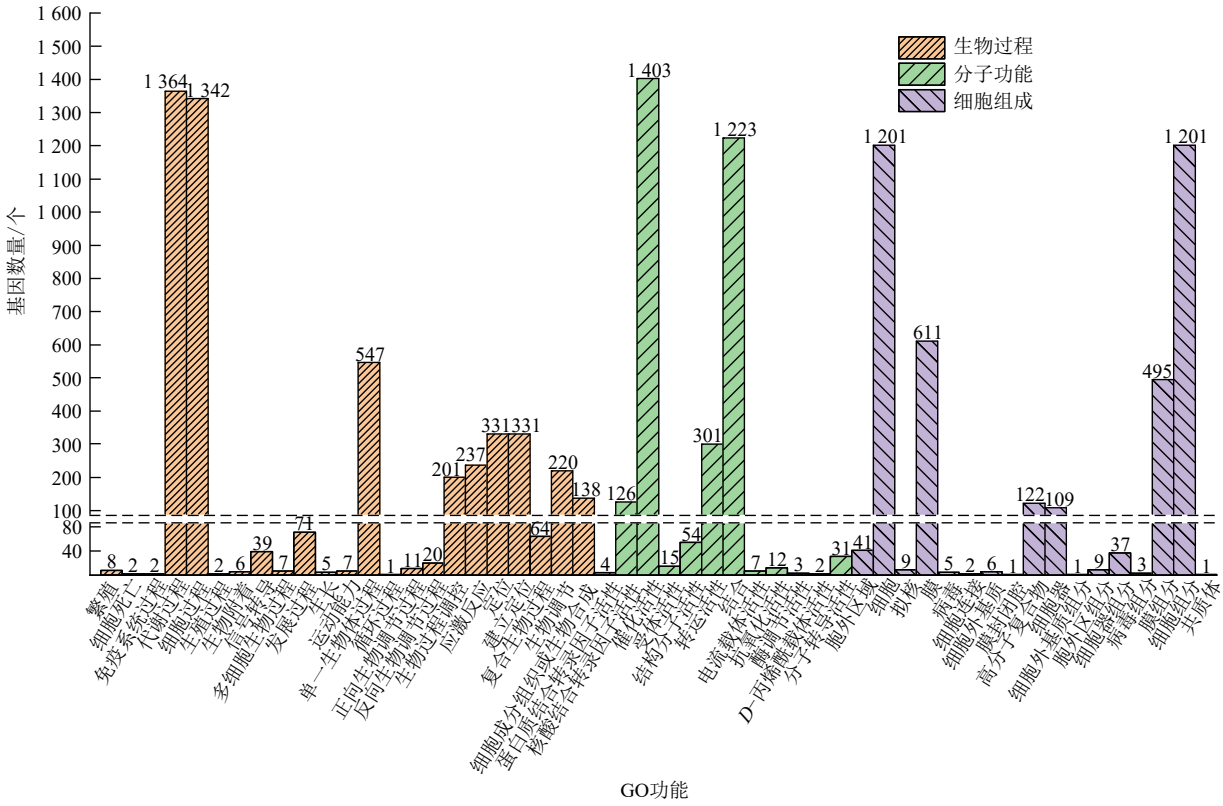


图7　GO数据库的基因功能注释结果

Fig. 7　Gene function annotation results in the GO database

3）KEGG数据库注释结果：为剖析基因功能，分析代谢途径，在KEGG数据库中进行基因注释。植物乳植杆菌r-JN-1共有1 240个基因在6大功能类别的31个通路上得到功能注释，其中72.95%的基因注释于代谢通路，结果如图8所示。分析发现植物乳植杆菌r-JN-1在代谢、环境信息处理和遗传信息处理中得到较多的基因功能注释。代谢途径中涉及碳水化合物代谢、酶家族和氨基酸代谢相关的基因较多，且具有较强的碳水化合物代谢能力，与GO数据库注释结果和糖酵解试验结果一致，这可能与其在发酵过程中可产生大量有机酸及多种次生代谢产物等作用相关。环境信息处理中有212个基因与膜运输相关，进一步进行跨膜蛋白预测分析，得到887个拥有跨膜螺旋的蛋白质序列，为乳酸菌的应用提供理论基础。结合杨帆[31]的研究结果，进一步注释发现，植物乳植杆菌r-JN-1拥有编码所有同型乳酸发酵及异型乳酸发酵代谢途径相关酶的基因，如编码乙醇脱氢酶的*adh*基因、编码乙酸激酶的*ak*基因、编码乳酸脱氢酶的*ldh*基因等，其中乳酸脱氢酶是乳酸代谢过程中的关键酶，植物乳植杆菌r-JN-1中含有3个*D*-乳酸脱氢酶和6个*L*-乳酸脱氢酶，生成*L*-乳酸的潜力较大。人体只能吸收代谢*L*-乳酸，其可作为酸味剂、防腐剂等应用于食品工业中，*L*-乳酸还具有提高人体免疫力的功能，在参与人体新陈代谢的过程中，能够抑制癌细胞的形成与扩散，同时*L*-乳酸乙酯是白酒的主要香气成分。而*D*-乳酸不易被酯化，会导致酿造环境酸度较高，且其含量较多时会损害人体肠胃功能。白酒风味会受到*D*-乳酸和*L*-乳酸比例的影响[32]，在酒类的酿造过程中，应优选产*L*-乳酸比例较高的乳酸菌，避免因为*D*-乳酸的积累对酒的品质造成破坏[7]。

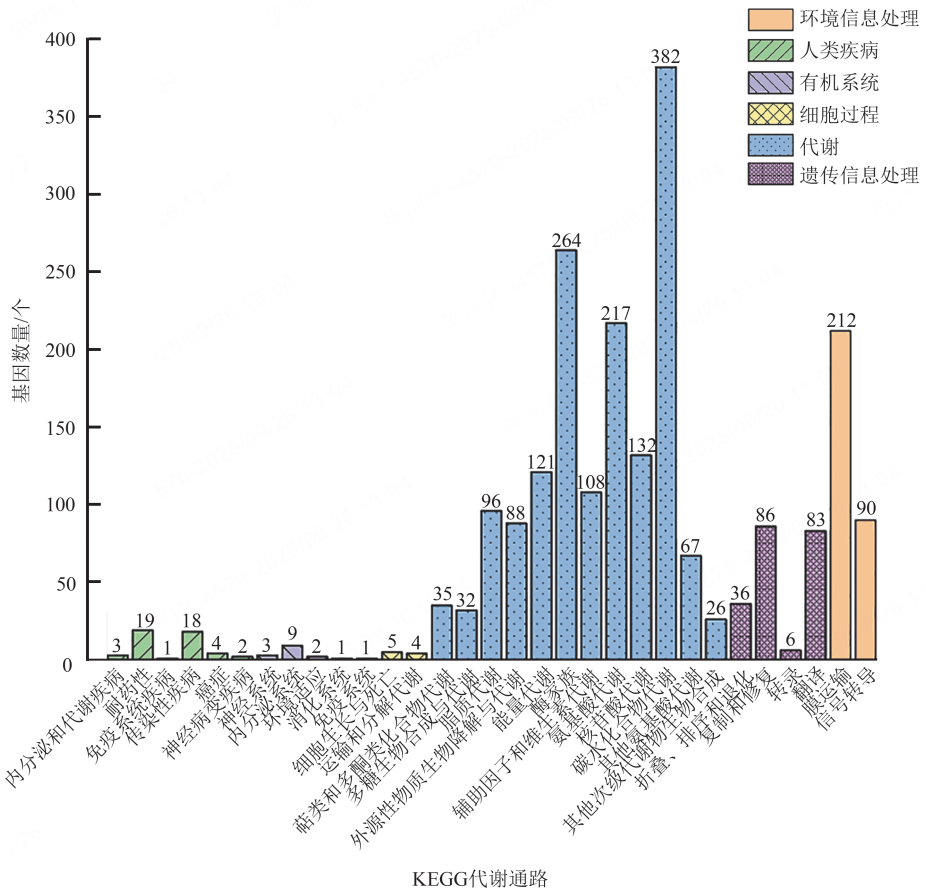


图 8　KEGG 代谢通路的基因注释结果

Fig. 8　Gene annotation results for KEGG metabolic pathways

4）CAZy 数据库注释结果：通过 CAZy 数据库注释，可以获取大量关于催化碳水化合物、糖复合物及糖苷合成或分解相关酶类的生物学信息。如图 9 所示，植物乳植杆菌 r-JN-1 在 CAZy 数据库中共有 149 个蛋白质编码基因被注释，其中糖苷水解酶（40.27%）得到注释最多，同时糖基转移酶（22.82%）和碳水化合物酯酶（18.79%）也得到较多注释。这些碳水化合物活性酶可通过催化糖类的分解与合成反应，调控葡萄糖、半乳糖等多种糖类的代谢，既为细菌活动提供必需的营养物质，也参与细菌的结构构建、信号传递等多种生物过程。在植物乳植杆菌 r-JN-1 基因组中，存在与 *L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖代谢相关的基因，如编码 *α*-*L*-鼠李糖苷酶（PROKKA_02699;PROKKA_02701）、阿拉伯糖苷酶（PROKKA_01580;PROKKA_02093）的基因，基因组分析结果与糖发酵试验结果一致，故植物乳植杆菌 r-JN-1 能代谢利用 *L*-鼠李糖、*L*-阿拉伯糖。

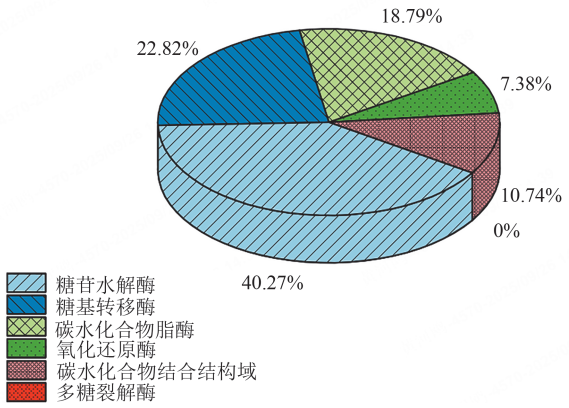


图 9　CAZy 功能分类注释

Fig. 9　CAZy functions obtained by gene function annotation

3　结论

该研究利用溶钙圈法从酱香型白酒窖泥中筛选得到 11 株乳酸菌，经过传统培养和 16S rDNA 基因序列测定，进行同源性分析与系统发育树构建，确定 11 株乳酸菌归属于 2 个属的 5 个种，其中 3 株为植物乳植杆菌，1 株为戊糖乳杆菌，4 株为棒状乳杆菌，1 株为短促生乳杆菌，2 株为台湾乳球菌。

11株乳酸菌中生长速率较快且产酸能力最强的为植物乳植杆菌r-JN-1。植物乳植杆菌r-JN-1的生物学特性结果显示，其pH、温度和NaCl溶液的耐受范围分别为4.0~10.0、25~40 ℃、0~7 g/dL，且该菌株可利用包括*L*-鼠李糖等多种糖类进行发酵，在其培养液中检测到20种挥发性成分。植物乳植杆菌r-JN-1基因组大小为3 330 678 bp，蛋白质编码基因有3 301个，大于普通乳杆菌基因组中蛋白质编码基因数量的平均值，推测其基因组所包含的功能区域较其他乳杆菌更为丰富。在COG数据库注释结果中，参与碳水化合物运输与代谢的基因占总注释基因的11.65%；在GO数据库注释结果中，被注释的基因数量最多的是代谢和催化作用；在KEGG数据库注释中，72.95%的基因在代谢通路上得到注释，其中碳水化合物代谢相关基因占比较大，且该菌株拥有编码所有同型乳酸发酵及异型乳酸发酵代谢途径中相关酶的基因。植物乳杆菌r-JN-1显示出较强的代谢能力并能生成多种风味物质，在酱香型白酒酿造过程中具有重要作用。该研究解析了酱香型白酒窖泥中乳酸菌的存在属性和代谢特性，为进一步开发乳酸菌资源提供了理论依据。

参考文献

[1] 李旭，霍颖玓，曹正珂，等. 砂石板窖底在酱香型白酒大回酒轮次中的应用研究[J]. 酿酒科技，2023(4)：65-69.
LI X，HUO Y Y，CAO Z K，et al. Application of sandstone pit bottom in the important production rounds of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology，2023(4)：65-69.(in Chinese)

[2] 冯海燕，卢君，王凡，等. 酱香型白酒封窖工艺研究[J]. 中国酿造，2022，41(11)：210-216.
FENG H Y，LU J，WANG F，et al. Pit-sealing technology of sauce-flavor Baijiu[J]. China Brewing，2022，41(11)：210-216.(in Chinese)

[3] 卢君，唐平，山其木格，等. 不同封窖方式对酱香白酒基础酿造的影响[J]. 食品与发酵工业，2020，46(2)：203-207.
LU J，TANG P，SHAN Q，et al. Effects of different cellar sealing methods on brewing process of Maotai-flavor Baijiu[J]. Food and Fermentation Industries，2020，46(2)：203-207.(in Chinese)

[4] 陈国伟，解修超，宋玉，等. 城固酒窖泥微生物多样性及糖代谢过程分析[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(6)：26-37.
CHEN G W，XIE X C，SONG Y，et al. Analysis of microbial diversity and sugar metabolism process in pit mud of Chenggu Baijiu[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(6)：26-37.(in Chinese)

[5] 栗连会，肖辰，陆震鸣，等. 泸型酒发酵酒醅中乳酸菌群落的来源、演替规律及功能预测[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(12)：1242-1247.
LI L H，XIAO C，LU Z M，et al. Origin，succession and potential function of lactic acid bacteria in fermented grains of Luzhou-flavor liquor[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37(12)：1242-1247.(in Chinese)

[6] 谢玉球，钟雨，谢旭，等. 乳酸菌在固态法白酒生产中的地位与作用[J]. 酿酒科技，2008(11)：83-86.
XIE Y Q，ZHONG Y，XIE X，et al. Roles & functions of lactic acid bacteria in the production of liquor by solid fermentation[J]. Liquor-making Science & Technology，2008(11)：83-86.(in Chinese)

[7] 李霄霄. 酱香型白酒中乳酸菌的分离及代谢特性研究[D]. 天津：天津科技大学，2021.

[8] 杨帆，杨玉波，刘延峰，等. 白酒酿造过程中*Lactobacillus panis*乳酸合成关键环境因子的鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(1)：36-42.
YANG F，YANG Y B，LIU Y F，et al. Identification of key environmental factors of lactic acid biosynthesis by *Lactobacillus panis* for Chinese liquor brewing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(1)：36-42.(in Chinese)

[9] LIU Y F，WAN B，YANG F，et al. Metabolomics-driven elucidation of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus panis* from Chinese Baijiu fermentation microbiome[J]. Fermentation，2022，8(1)：33.

[10] 吴成，王春晓，王晓丹，等. 高通量测序技术在酿酒微生物多样性研究中的应用[J]. 食品科学，2019，40(3)：348-355.
WU C，WANG C X，WANG X D，et al. A review of the application of high-throughput sequencing technology in analysis of the diversity of microbial communities involved in the fermentation of alcoholic beverages[J]. Food Science，2019，40(3)：348-355.(in Chinese)

[11] 邓杰，卫春会，边名鸿，等. 浓香型白酒不同窖龄窖池窖泥中古菌群落结构分析[J]. 食品科学，2017，38(8)：37-42.
DENG J，WEI C H，BIAN M H，et al. Archaeal community analysis of pit mud from cellars of different ages for Luzhou-flavor liquor[J]. Food Science，2017，38(8)：37-42.(in Chinese)

[12] 邓杰，黄治国，卫春会，等. 基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析[J]. 现代食品科技，2015，31(7)：50-55.
DENG J，HUANG Z G，WEI C H，et al. High-throughput sequencing reveals bacterial structure in the mud pits of heavy-fragrance Baijiu[J]. Modern Food Science and Technology，2015，31(7)：50-55.(in Chinese)

[13] 翟磊，于学健，冯慧军，等. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌的群落结构[J]. 食品与发酵工业，2020，46

(2):18-24.
ZHAI L, YU X J, FENG H J, et al. Study on bacterial community structure in the brewing habitats of strong flavour Chinese Baijiu from Yibin region[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2):18-24.(in Chinese)
[14] 蔡雪梅,蒋英丽,吴联海,等. 不同区域酱香型白酒人工窖底泥细菌多样性及其影响因子[J]. 食品科学,2017,38(10):87-91.
CAI X M, JIANG Y L, WU L H, et al. Diversity of bacteria and its influencing factors in bottom pit mud from artificial cellars used for the production Maotai-flavor liquor in different regions[J]. Food Science, 2017, 38(10):87-91.(in Chinese)
[15] 任海伟,孙一帆,王希,等. 不同窖龄及位置浓香型白酒窖泥中细菌群落结构的差异性分析[J]. 食品与发酵工业,2023,49(9):103-111.
REN H W, SUN Y F, WANG X, et al. Difference analysis of bacterial community structure in pit mud with different ages and position[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(9):103-111.(in Chinese)
[16] LIU M K, TANG Y M, ZHAO K, et al. Contrasting bacterial community structure in artificial pit mud-starter cultures of different qualities: a complex biological mixture for Chinese strong-flavor Baijiu production[J]. 3 Biotech, 2019, 9(3):89.
[17] LI D J, JIA F G, WANG L L, et al. The initial composition and structure of microbial community determined the yield and quality of Baijiu during the spontaneous fermentation[J]. International Microbiology, 2024, 27(1):143-154.
[18] 沈毅,陈波,王西,等. 酱香型郎酒高温大曲、酒醅和窖泥中细菌群落结构分析[J]. 中国酿造,2020,39(2):89-93.
SHEN Y, CHEN B, WANG X, et al. Analysis of bacterial community structure in high temperature Daqu from sauce-flavor Langjiu, fermented grains and pit mud[J]. China Brewing, 2020, 39(2):89-93.(in Chinese)
[19] 孙优兰,尹延顺,骆红波,等. 不同产区酱香型白酒感官特性及特征风味分析[J]. 酿酒科技,2023(7):57-64,71.
SUN Y L, YIN Y S, LUO H B, et al. Analysis of sensory characteristics and typical flavor of Jiangxiang Baijiu from different producing areas[J]. Liquor-making Science & Technology, 2023(7):57-64,71.(in Chinese)
[20] 孟镇,张媛媛,胡雯钦,等. 湖南地区酱香型白酒酒醅细菌多样性及其与基酒风味物质相关性分析[J]. 中国酿造,2023,42(6):28-36.
MENG Z, ZHANG Y Y, HU W Q, et al. Bacterial diversity of fermented grains of sauce-flavor Baijiu and its correlation with flavor compounds of base liquor in Hunan area[J]. China Brewing, 2023, 42(6):28-36.(in Chinese)
[21] 杨然,张笑雨,刘朋肖,等. 耐热木聚糖酶菌株的筛选鉴定及发酵条件分析[J]. 食品科学,2019,40(18):101-107.
YANG R, ZHANG X Y, LIU P X, et al. Screening and identification of heat-resistant xylanase-producing strain and investigation of fermentation conditions[J]. Food Science, 2019, 40(18):101-107.(in Chinese)
[22] 王梦创. 基于CRISPR系统的酱香型白酒酿造微生物面包乳杆菌和植物乳杆菌定量方法的设计与构建[D]. 无锡:江南大学,2022.
[23] 钟源,张雅雯,吕健曼,等. 广西酸笋微生物多样性分析及其乳酸菌的特性研究[J]. 中国调味品,2023,48(5):1-9.
ZHONG Y, ZHANG Y W, LYU J M, et al. Analysis of microbial diversity of Guangxi sour bamboo shoots and study on their lactic acid bacteria characteristics[J]. China Condiment, 2023, 48(5):1-9.(in Chinese)
[24] 彭玲玲. 植物乳杆菌ZDY2013的耐酸机理及对饮食诱导的非酒精性脂肪肝缓解作用的研究[D]. 南昌:南昌大学,2023.
[25] 郑彦坤. 植物乳杆菌LP-F1基因组和糖代谢研究及在发酵乳中的应用[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2021.
[26] 杜刚. 3-羟基丁酮的研究进展[J]. 广东化工,2016,43(24):106-107.
DU G. Progress in research of 3-hydroxy-2-butanone[J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(24):106-107.(in Chinese)
[27] 陈诗佳,李玲玲,陈叶福,等. 高产乙偶姻酵母菌种的选育与提高白酒中四甲基吡嗪含量的研究[J]. 酿酒科技,2018(10):114-119.
CHEN S J, LI L L, CHEN Y F, et al. Breeding of yeast strains with high-yield of acetoin and its application in Baijiu production to improve tetramethylpyrazine content[J]. Liquor-making Science & Technology, 2018(10):114-119.(in Chinese)
[28] VAN DEN NIEUWBOER M, VAN HEMERT S, CLAASSEN E, et al. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome[J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(4):452-465.
[29] LUCIO O, PARDO I, HERAS J M, et al. Influence of yeast strains on managing wine acidity using *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Control, 2018, 92:471-478.
[30] 薛志朋. 基于乳糖代谢关键酶的植物乳杆菌食品级表达系统构建和应用[D]. 济南:齐鲁工业大学,2023.
[31] 杨帆. 酱香型白酒中乳酸代谢机理及调控策略的研究[D]. 无锡:江南大学,2020.
[32] 黄艳娜,许光涛,游春苹. 乳酸菌中乳酸脱氢酶的研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(8):369-373.
HUANG Y N, XU G T, YOU C P. The research progress of the lactate dehydrogenases in lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(8):369-373.(in Chinese)

(责任编辑:闫林红)